

BARCODING OF LIFE: БЕЛАРУСЬ – УЧАСТНИК ГЛОБАЛЬНОЙ ИНИЦИАТИВЫ ПО ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЮ ЖИЗНИ

Н.В. Воронова, С.В. Ризевский, В.П. Курченко, С.В. Буга

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В начале XXI века таксономия получила в свое распоряжение уникальный по точности и удобству инструмент – ДНК-штрихкод, позволяющий идентифицировать виды на основе отдельных фрагментов организма, его биологических жидкостей, а также стадий жизненного цикла с недостаточным количеством морфологических признаков [1]. Несмотря на обширную работу, проведенную систематиками по изучению биологического разнообразия планеты, до сих пор существуют определенные сложности с точной и однозначной идентификацией представителей некоторых таксонов. Кроме того, многие ценные образцы невозможно идентифицировать по причине их механических повреждений и утраты определяющих морфологических признаков. Для значительного числа организмов идентификация до уровня вида на стадии яйца, личинки, семени или проростка методологически невозможна. Применение ДНК технологий в этих случаях позволяет науке использовать колоссальный объем прежде недоступной информации [2, 3].

Ценность подхода, который позволяет проводить видовую идентификацию по фрагментированному биологическому материалу, очевидна как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. Сегодня ДНК-штрихкодирование широко применяется исследователями в области биоразнообразия и защиты исчезающих видов, карантинными, мониторинговыми и таможенными службами, криминалистами и эпидемиологами для решения собственных прикладных задач. Важной областью использования метода ДНК-идентификации видов является контроль происхождения продуктов питания с целью противодействия промыслу редких и исчезающих видов. При использовании организмов в качестве источника ценных биологически активных соединений точная идентификация организма необходима для предотвращения негативных последствий и экономических потерь при биотехнологическом производстве.

Несмотря на ряд преимуществ, практическое использование метода ДНК-штрихкодирования имеет свои ограничения. Существуют таксоны, для которых применение традиционных и проверенных на других группах живых организмов подходов невозможно. В этих случаях приходится вести поиск новых молекулярных маркеров видовой идентификации, что требует времени и снижает универсальность метода. Для систематизации, хранения и анализа данных, получаемых при изучении различных таксонов, создан Глобальный банк данных ДНК-штрихкодов, который активно пополняется, благодаря добровольным усилиям международного научного сообщества [4, 5]. В 2014 г. Беларусь присоединилась к глобальной инициативе по ДНК-штрихкодированию жизни, а Белорусский государственный университет вошел в число организаций и научных центров – членов мирового консорциума The International Barcode of Life (iBOL).

ДНК-штрихкодирование живых организмов: теория и практические инструменты

В основе концепции ДНК-штрихкодирования лежит представление о том, что каждый биологический вид на планете может быть идентифицирован по ДНК как по своеобразным «отпечаткам пальцев». Однако для того, чтобы этот подход был применим в реальной жизни, требуется, чтобы идентификация проходила не на основе анализа всего генома или его произвольного участка, а по некой короткой (для удобства получения и секвенирования) и универсальной (для получения возможности объединять данные разных исследователей) последовательности ДНК. Этот участок должен отвечать двум важнейшим требованиям: используемая последовательность ДНК должна быть идентичной у всех представителей

одного вида, в том числе принадлежащих к разным популяциям (1), и отличаться от такой же последовательности ДНК других видов (2). После долгих поисков, начатых еще в 90-е годы [6], такие участки генома были найдены для всех царств живых организмов, пока, к сожалению, исключая протистов. Для животных в качестве ДНК-штрихкода используется митохондриальный ген субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI), для растений – пластидные гены рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcL*) и матуразы *K* (*matK*), для грибов – внутренние транскрибируемые спейсеры ядерных генов рибосомальных РНК (ITS), а для прокариот – ген рРНК субъединицы рибосомы с коэффициентом седиментации 16 (16S rRNA). Буквенные последовательности фрагментов этих генов представляют собой штрихкоды, доступные для автоматизированного хранения и анализа.

Процедура идентификации образца по существующему ДНК-штрихкоду сравнительно проста. Она включает выделение тотальной ДНК из биоматериала, проведение ПЦР с универсальными геноспецифическими праймерами (т.е. пригодными для амплификации одного и того же гена у самых разных организмов) и секвенирование полученного ДНК-фрагмента. После получения буквенной записи расшифрованного участка генома, исследователю остается провести компьютерное сравнение этой последовательности с ДНК-штрихкодами, хранящимися в Глобальной базе данных ДНК-штрихкодов живых организмов (BOLD), используя специализированный бесплатный сервис системы BOLD [7]. Применяемые в этом процессе лабораторные протоколы требуют минимального количества сложного и дорогостоящего оборудования или затрат на реактивы. Время, требуемое для идентификации одного образца, может составлять не более 2–3 дней.

Иначе обстоит ситуация с пополнением электронной базы ДНК-штрихкодов. Поскольку ДНК-штрихкод представляет собой эталон, по которому в будущем будет осуществляться идентификация неизвестных образцов, чрезвычайно важно, чтобы определение видовой принадлежности образца, служащего для получения эталонного штрихкода, было проведено специалистом-систематиком максимально тщательно, с учетом всего комплекса морфологических, биологических и экологических признаков. Каждый ДНК-штрихкод, размещенный в BOLD, сопровождается фотографией ваучерного образца (в данном случае им может служить только морфологически неповрежденный организм либо культура штамма) с подробным указанием места хранения, географической точки его происхождения и всей сопутствующей информации, необходимой для будущей верификации таксономии, если такая потребность возникнет. В области получения ДНК-штрихкодов для биологических видов, которые ранее не были паспортизированы, требуется тесное сотрудничество ученых-систематиков, работающих с конкретными группами живых организмов, и специалистов в сфере ДНК-технологий. В настоящее время такое сотрудничество с успехом осуществляется в большинстве крупнейших научных центров мира.

Создание Глобального консорциума по ДНК-штрихкодированию жизни

Идея ДНК-штрихкодирования впервые привлекла внимание научного сообщества в 2003 г., когда Пол Хеберт и его исследовательская группа из университета Гуэлфа в Канаде опубликовали статью «Биологическая идентификация видов при помощи ДНК-штрихкодов» [8]. В ней авторы предложили новую систему идентификации видов по короткому стандартизированному участку ДНК, используемому в качестве молекулярного паспорта, который потенциально может быть получен для каждого биологического вида планеты. Предлагаемый подход был признан настолько многообещающим, что в 2004 г. при поддержке фонда Альфреда П. Слоуна был создан «Консорциум по ДНК-штрихкодированию жизни» (Consortium for the Barcode of Life, CBOL) [9]. Через два года общий размер финансирования проекта, который вначале объединял только канадских и американских исследователей, благодаря участию государственных и частных фондов Канады, составил 2 миллиона долларов. При университете Гуэлфа был открыт Канадский Институт

биоразнообразие в Онтарио, который взял на себя труд по поддержанию и развитию глобального банка ДНК-штрихкодов.

В 2007 г. проект по ДНК-штрихкодированию жизни становится международным, запускается глобальная инициатива по ДНК-штрихкодированию – iBOL (International Consortium for the Barcode of Life). По коллективному соглашению стран-участниц основной миссией iBOL является расширение географического охвата и таксономического объема библиотеки ДНК-штрихкодов, хранение полученных штрихкодов, а также обеспечение коллективного и свободного доступа к системе BOLD исследователям всего мира. Своей главной фундаментальной целью Международный консорциум называет изучение и сохранение биологического разнообразия планеты, исследование эволюции живых организмов, выявление новых видов, а также объединение ученых из разных стран, работающих в области биоразнообразия, и просветительская работа в сфере сохранения видов.

Несмотря на очевидную значимость, изучение биологического разнообразия, поиск и описание новых видов никогда прежде не получали значительной поддержки со стороны научного сообщества и финансовых институтов. Благодаря созданию iBOL, система BOLD в настоящее время содержит ДНК-штрихкоды более чем 100 000 видов живых организмов и объединяет 170 научных центров из 50 стран-участниц [10]. Совместные усилия позволяют всем участвующим странам значительно снизить затраты на проведение многих исследований и повысить их информативность за счет доступа к бесплатным общим ресурсам, развитие которых обеспечивают все участвующие страны в соответствии с национальными возможностями. Экономический эффект от развития методов ДНК-штрихкодирования как инструмента биомониторинга, как ожидается, будет очень значительной. Глобализация торговли, развитие транспорта и изменение климата уже сегодня на всех территориях приводят к быстрому росту количества инвазивных видов, которые могут угрожать сельскому и лесному хозяйству, рыболовству и здоровью населения. Использование ДНК-штрихкодов предоставляет возможность быстро выявлять инвазивные виды, предотвращая их распространение и сокращая таким образом затраты на борьбу с ними. ДНК-штрихкодирование позволит развить и улучшить существующие стратегии контроля численности вредителей и переносчиков заболеваний, а также усилит системы противодействия торговле редкими и исчезающими видами, браконьерству, мошенничеству в сфере производства одежды и продуктов питания [11, 12, 13].

Беларусь как участник iBOL

iBOL имеет многоуровневую структуру, в которой страны-партнеры представляют собой Узлы проекта. Узлы делятся на три категории: национальные, региональные и центральные. Центральные узлы обеспечивают финансовую поддержку проекта, а также наиболее массированное получение и обеспечение сохранности информации. В настоящее время центральные узлы iBOL, это Канада, Китай, США и Европейский союз. Региональные узлы в качестве полноправных участников занимаются курированием исследований в области ДНК-штрихкодирования в регионе, пополнением глобальной базы данных новыми ДНК-штрихкодами, организацией тематических конференций и образовательных мероприятий. По соглашению, региональный узел должен обеспечивать расширение BOLD на 2000 последовательностей в год, и сегодня этому критерию соответствуют 10 стран со всех континентов. Национальные узлы сосредоточены на сборе, определении и хранении ваучерных образцов на территории своих стран, а также на передаче биологического материала в организации центральных узлов для секвенирования и депонирования последовательностей в базах данных.

Восточно-европейское пространство до настоящего момента представлено только одним региональным узлом – RUS-BOL, объединяющим исследователей Российской Федерации. В 2007 г. в Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского (ИБМ) Дальневосточного отделения РАН прошло Всероссийское рабочее совещание, и был

образован координационный комитет программы по ДНК-штрихкодированию видов рыб. В 2008 г. ИБМ стал членом CBOL. В 2010 г. Россия вошла в iBOL с созданием координационного совета под председательством д.б.н., профессора Ю.Ф. Картавцева. Сегодня координационный совет RUS-BOL координирует все работы по ДНК-штрихкодированию видов в Российской Федерации.

В последние годы работы по ДНК-штрихкодированию представителей флоры и фауны Беларуси с успехом осуществляются в Белорусском государственном университете [14], Институте генетики и цитологии НАН Беларуси и других научных центрах. Белорусские исследователи, работающие в этой области, до сих пор не взаимодействовали друг с другом, не имели возможности обмениваться опытом и информацией, не проводили совместных мероприятий в сфере общих научных интересов. В 2014 г. было принято решение о централизации этого процесса и присоединении Белорусского государственного университета к региональному узлу RUS-BOL в качестве равноправного иностранного члена. Присоединение к действующему региональному узлу без создания национального узла влечет за собой ряд преимуществ: сохранение приоритета на использование и авторство в отношении полученных ДНК-штрихкодов, возможность проводить международные мероприятия при поддержке организаций-участниц RUS-BOL, а также дополнительные возможности для получения финансирования в области работы по ДНК-штрихкодированию живых организмов в рамках проектов Союзного государства и ФФИ России и Беларуси. На заседании координационного совета RUS-BOL, которое состоялось 11 июня 2014 г. в Институте общей генетики РАН (г. Москва), Белорусский государственный университет как представитель Беларуси был принят в состав RUS-BOL с введением доцента кафедры зоологии, к.б.н. Н.В. Вороновой в Координационный совет в качестве ученого секретаря.

Присоединение Белорусского государственного университета к Глобальному консорциуму по ДНК-штрихкодированию жизни влечет за собой новые возможности и научные обязательства. Если о возможностях было сказано ранее, то в ряду добровольно взятых на себя обязательств следует назвать готовность сотрудников кафедры зоологии БГУ к сотрудничеству с исследователями из других научных центров в области обмена информацией, консультационной помощи, обучения специалистов и содействия в поиске заинтересованных в сотрудничестве коллег из Российской Федерации и других стран-участниц iBOL.

Благодарности

Авторы искренне благодарят председателя координационного совета RUS-BOL профессора Ю.Ф. Картавцева, а также декана биологического факультета БГУ В.В. Лысака за всестороннюю поддержку процесса присоединения БГУ к RUS-BOL.

Список литературы

1. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding / V. Savolainen [et al.] // *Philosophical Transactions of the R. Soc. Lond. B., Biological Sciences.* – 2005. – Vol. 360. – P. 1805–1811.
2. DNA barcoding to improve the species-level management of wireworms (Coleoptera: Elateridae) / F.E. Etzler [et al.] // *J. Economical Entomology.* – 2014. – Vol. 107, N. 4. – P. 1476–1485.
3. Detecting ingested plant DNA in soil-living insect larvae / K. Staudacher [et al.] // *Soil Biol. Biochemistry.* – 2011. – Vol. 43, N. 2. – P. 346–350.
3. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology / U. Jinbo [et al.] // *Entomological Science.* – 2011 – N. 14 – P. 107–124.
4. DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps / G. Ditrich-Schroder [et al.] // *Molecular Ecology Resources.* – 2012. – Vol. 12. – P. 109–115.

5. A tiered barcode authentication tool to differentiate medicinal *Cassia* species in India // N. Purushothaman [et al.] // *Genetics and Molecular Research*. – 2014. – Vol. 13, N. 2. – P. 2959–2968.
6. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 3, N. 5. – P. 294–299.
7. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) / S. Ratnasingham // *Molecular Ecology Note*. – 2007. – Vol. 7, N. 3. – P. 355–364.
8. Biological identifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // *Proc. R. Soc. Lond. B., Biol. Sci.* – 2003. – V. 270. – P. 313–321.
9. Barcoding Life to Conserve Biological Diversity: Beyond the Taxonomic Imperative / R. Vernooy [et al.] // *PLoS Biology*. – 2010. – Vol. 8, Iss. 7. – e1000417.
10. Miller, S.E. Proposed standards for BARCODE records in INSDC (BRIs) / In request document for continuation of support by the Alfred P. Sloan Foundation submitted by the Smithsonian Institution on behalf of Consortium for the barcode of Life. – Ed. H. Robert. – 2006. – 22 January. – P. 36–38.
11. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics / M. Hajibabaei [et al.] // *TRENDS in Genetics*. – 2007. – Vol. 23, Iss. 4. – P. 167–172.
12. DNA barcoding for ecologists / A. Valentini [et al.] // *Trends in Ecology and Evolution*. – 2008. – Vol. 24, Iss. 2. – P. 110–117.
13. DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market / A. Armani [et al.] // *Food Control*. – 2015. – Vol. 50. – P. 589–596.
14. Voronova, N.V. Subspecies identification in aphids (Homoptera: Aphididae) by application of partial sequence of cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene: a view on the potential of method / N.V. Voronova // *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*. – 2014. – Vol. 6, N. 1. – P. 01–06.